

# Sytokiniinit ja niiden käyttö solukkoviljelyssä

Milla Luukkainen

LuK- tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma, biotieteet

Oulun Yliopisto

Kevät 2019

# Sisällysluettelo

1	Johdanto .....	4
1.1	Kasvihormonit ja niiden merkitys .....	4
1.2	Solukkoviljely menetelmänä .....	5
2	Sytokiniini yhdisteenä .....	6
2.1	Luonnossa esiintyvät sytokiniinit .....	7
2.2	Sytokiniinin luonnollinen biosynteesi .....	8
2.2.1	MEP- synteesireitti .....	9
2.2.2	MVA- synteesireitti .....	10
2.2.3	Muut modifikaatiot .....	11
2.3	Synteettiset sytokiniinit .....	13
3	Sytokiniinin kuljetus ja vaikutukset kasvilla .....	14
3.1	Sytokiniinien kuljetus .....	14
3.2	Sytokiniinien signalointi .....	15
3.3	Sytokiniinien vaikutukset .....	15
3.3.1	Solusyklin säätely .....	16
3.3.2	Lehden pintasolukon muodostuminen .....	16
3.3.3	Senesenssin hidastaminen tai estäminen .....	16
3.3.4	Ravinteiden säätely .....	17
4	Sytokiniinin käyttö kaupallisessa tuotannossa .....	17
4.1	Esimerkkilajina <i>Aloe vera</i> sp. ....	18
5	Johtopäätöksiä .....	19
6	Lähteluettelo .....	20

Lyhenteet

Lyhenne		Lyhenne	
cZ	cis-Zeatiini	cZRMP	cZ ribosidi 5'-monofosfaatiksi
tZ	trans- Zeatiini	iPRMP	iP ribosidi 5'-monofosfaatti
iP	N <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -isopentanyyli)adeniini	ENT	tasapainottavat nukleosidisiirtäjät ( <i>eng.</i> Equilibrium nucleoside transporters)
DZ	dihydrozeatiini	ABC	ATP sitoja ( <i>eng.</i> ATP-binding cassette)
oT	orto-topolin	PUP	puriinipermeaasit
mT	meta-topolin	K	Kinetiini/ N <sup>6</sup> -(furfyyliamino)puriini
BA/ BAP	Bentsyyliadeniini/6-bentsyyliaminopuriini	TDZ	thidiazuroni
MeoT	orto-metoksitopoliini	CP PU	N-fenyyli-N'(s-kloro-4-pyridyyli)urea
MemT	meta-metoksitopoliini	DPU	N, N'-feenyyliurea
MEP	metyylierytritolidifosfaatti	AHK	Arabidobsiksen histidiinikisaanit
MVA	mevalonaatti		
HMBDP	hydroksimetyyliibutenyylidifosfaatti		
DMAPP	dimetyyliallylidifosfaatti		
CKX	oksidaasi/dehydrokinaasi		

# 1 Johdanto

Hormonit ovat elämän toiminnalle välttämättömiä, niiden vaikuttaessa elintoimintojen ylläpitoon ja viestien välittäjinä niin ulkoisten, kuin sisäistenkin ärsykkeiden johdosta. Hormonit voivat välittää viestejä paikallisesti tai pitkiä matkoja, jopa toiselle puolelle organismia. Hormonit vaikuttavat organismien elinten muodostamiseen ja kasvunsäätelyyn läpi eliön elämän, aina solujen jakautumiseen ja lopulliseen solukuolemaan (Doerner, 2000, s.528). Kasveilla hormonit voivat olla veteen liukoisia ja nestemäisiä molekyylejä tai ne voivat olla myös kaasuja, joista esimerkkinä toimii etyleeni. Hormonit muodostetaan tyypillisesti hormonien tuotantoon tarkoitetuissa rauhasissa eri puolilla eläintä, mutta kasveilta puuttuu tällaiset rauhaset. Kasveilla hormonit tuotetaan eri puolilla kasvia paikallisesti tai kuljetettavaksi (Srivastava, 2002, s.143).

Kasvihormoneja tunnustetaan koko ajan lisää ja niiden vaikutuksia tutkitaan jatkuvasti. Sytokiniini on yksi ensimmäisistä löydettyistä kasvihormoneista ja sitä on pidetty kasvin kehittymiselle välttämättömänä. Solukkoviljely tekniikoiden kuitenkin kehittyessä sytokiniinien käyttö solukkoviljelyssä voi vähentyä sillä kasveja on onnistuttu kasvattamaan ilman sytokiniinin ulkoista lisäystä (Davies & Deroles, 2014). Tämän vuoksi herääkin kysymys, tarvitaanko kasvin ulkopuolista sytokiniiniä enää *in vitro* viljelmissä?

Tämä LuK- tutkielma käsittelee sytokiniinin merkitystä luonnollisena kasvihormonina ja yhdisteenä, kuten myös sytokiniinin synteettisten vastineiden merkitystä ja vaikutusta solukkoviljelyssä. Lisäksi tarkastellaan sytokiniiniin osuutta kasvin kehityksessä ja hormonaalisen homeostasian ylläpidossa.

## 1.1 Kasvihormonit ja niiden merkitys

Kuten eläimilläkin, kasvien kasvua ja kehitystä säätelevät hormonit. Kasvihormoneista voidaan nimetä viisi tärkeintä ja ”klassista” hormonia; auksiinit, sytokiniinit, gibberiliinihappo, abskissihappo ja etyleeni. Kuitenkin hormoneja on olemassa enemmän, joista esimerkkejä ovat jasmonaattihappo, brassinosteroidit, salisyylihappo, polyamiinit, oligosakkaridit ja sistemiinit jotka kuuluvat peptideihin. Jokaisella kasvihormonilla on tärkeä roolinsa kasvin kehityksen eri vaiheissa, mutta homeostasian ylläpidon vuoksi kasveille on myös tärkeää pystyä inhiboimaan hormonien vaikutuksia, kun niitä ei enää tarvita (Srivastava, 2002, s. 141). Kasvihormoneihin voidaan myös

usein viitata kasvin kasvusäätelijöinä (PGR) (Collin & Edwards, 1998, s. 21) ja termillä viitataan niin luonnollisiin, kuin synteettisiin kasvihormoneihin. Sanalla kasvihormonit kuitenkin viitataan yhdisteisiin, joita kasvi itse tuottaa (Srivastava, 2002, s. 143–144).

Signaalimolekyyleinä toimivat kasvihormonit ovat usein vasteena ympäristöllisille tekijöille (Crozier ym., 2000, s.850), joista yksi esimerkki on auringonvalon vaikutus. Kasvihormonien aiheuttamat vasteet ovat tyypillisiä tietyssä aikana ja tietyissä soluissa ja hormoneja tarvitaan tyypillisesti vain pieniä määriä, jotta haluttu vaste saavutetaan. (Srivastava, 2002, s.143). Mutaatiot ja erilaiset inhibiittorit ovat keskeisessä roolissa kasvihormonien vaikutusten, kuten myös niiden biosynteesireittien tutkimuksessa ja ymmärtämisessä (Crozier ym., 2000, s.850).

Mutaatiot, jotka vaikuttavat hormonien syntetisointiin voivat johtaa liiallisen tai liian vähäiseen synteisiin. Tällöin yhdellä mutaatiolla voi olla suurikin vaikutus kasvin sisäiseen hormonaaliseen homeostaasiaan. Säätelymekanismit, joiden avulla kasvit säätelevät hormonien molekyyligradientin määrää soluissa, voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään. Ensimmäinen tapa on suoraan biosynteesin tahdin sääteleminen, toisena tapana on valmistettujen yhdisteiden bioaktiivisuuden vähentäminen konjugaattien avulla. Kolmantena vaihtoehtona hormonaalisen homeostasian säätelyssä yhdisteen bioaktiivisuus estetään rikkomalla yhdiste kokonaan. (Srivastava, 2002, s. 151).

## 1.2 Solukkoviljely menetelmänä

Solukkoviljelyn ansiosta voidaan kasvattaa maantieteellisestä lokaatiosta, vuodenajasta tai ympäristöoloista riippumattomasti kohde kasveja ympärivuotisesti yhtäjaksoisella kasvukaudella. Sen muita hyötypuolia ovat riippumattomuus maatalouskemikaaleista ja luonnossa hankalasti viljeltävien tai harvinaisten kasvien kasvattaminen kontrolloidusti (Davies & Deroles, 2014). Myös uhanalaisten kasvikantojen elvyttäminen ja sukupuuton ehkäisy on mahdollista solukkoviljelyn avulla (Liao ym., 2004). Viljelmien aloitukseen ei vaadita paljoa solukkoa lähtömateriaalina, jotta se voidaan moninkertaistaa (Collin & Edwards, 1998, s. 6).

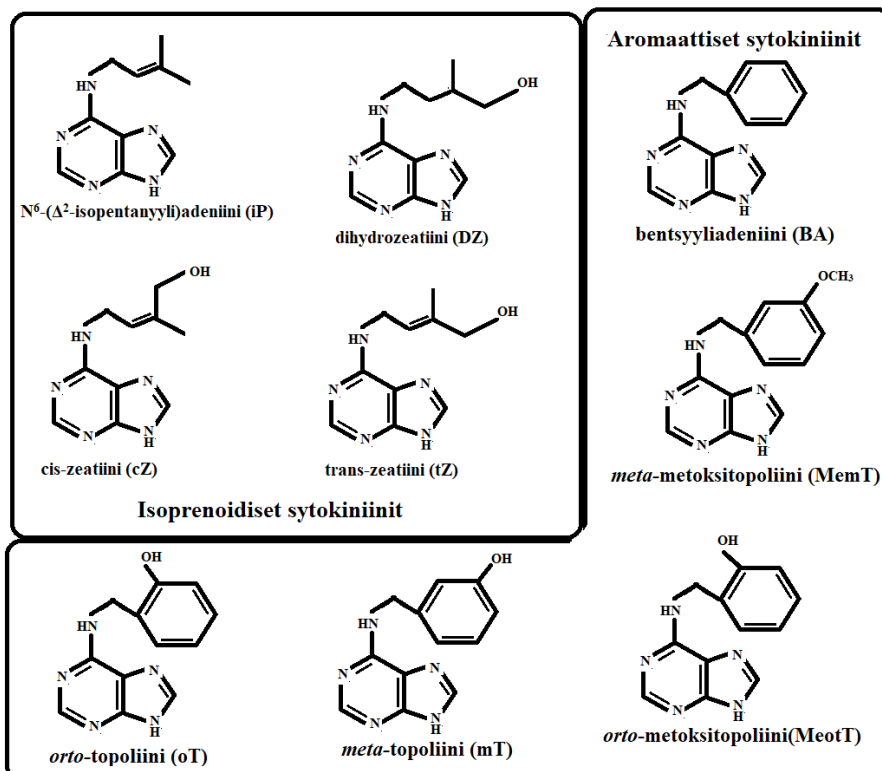
Kasvisolukkoja voidaan viljellä useammalla erilaisella kasvatusalustalla, joilta kaikilta löytyy eri suhteessa; pääravinneaineet (makroravinteet), hiven- ja kivennäisaineet (mikroravinteet), rautaa, vitamiineja, kasvihormoneja, hiiltä ja mahdollisesti orgaanista typpeä. Solukkoja voidaan viljellä kiinteällä, semi-kiinteällä tai nestemäisellä alustalla (Gantait ym., 2014). Jos kasvualusta on kiinteä, myös agarია on lisättävä kasvatusalustan seokseen (Collin & Edwards, 1998, s.23). Agarin sijasta myös phytageliä voi käyttää kasvatusalustan kiinteyttämiseen (Bindu ym., 2007).

Kasvatusalustasta riippuen solukoilla voidaan tehdä nestemäisiä suspensioviljelmiä, kiinteitä alkio-, meristeemi-, silmu tai siemenaiheviljelmiä, protoplastiviljelmiä fuusion avulla, sekä haploidiviljelmiä. Solukkoviljelyn avulla voidaan saavuttaa synteettinen kasvin organogeneesi tai embryogeneesi (Collin & Edwards, 1998, s. 5).

## 2 Sytokiniini yhdisteenä

Nimitystä sytokiniini käytetään luonnollisesti kasveissa esiintyvistä adeniinipohjaisista kasvihormoneista, joissa kaikissa on sama perusrakenne, mutta vaihtelevia sivuketjuja ja biosynteesin jälkeisiä muutoksia. Sytokiniineiksi kutsutaan myös synteettisesti valmistettuja luonnollisten sytokiniinien lailla käyttäytyviä yhdisteitä, jotka voivat erota toisistaan ja luonnollisista sytokiniineista suurestikin molekulaariselta rakenteeltaan (Mok & Mok, 2001). Synteettisillä sytokiniineillä voi kuitenkin olla eroja keskenään siihen, miten ne vaikuttavat kasvin kehitykseen (Molsaghi ym., 2014).

Ennen ensimmäisten sytokiniinien löytöä, aavistuksia ja havaintoja solukon jakautumista edistävästä vesiliukoisesta yhdisteestä oli jo tehty. Ensimmäiset 1913 vuoden havainnot vesiliukoisuudesta oli Gottlieb Haberlandt:n havainto perunan mukuloiden solukon jakautumisen kasvu nilasta tihkuvan eritteen avulla ja myöhempi havainto 1921 kasvin korjausmekanismin häirinnästä vesihuuhtelun avulla (Kamínek, 2015; Srivastava, 2002, s.191).



(Kuva 1. Luonnossa kasveissa esiintyvät isoprenoidiset ja aromaattiset sytokiniinit ja niiden molekulaariset rakenteet. Kuva on tehty artikkelin Cytokinin: Activity, Biosynthesis, and Translocation (Sakakibara, 2006) pohjalta)

## 2.1 Luonnossa esiintyvät sytokiniinit

Ensimmäinen kasvista löydetty ja eristetty sytokiniini oli trans-Zeatiini (tZ) (Crozier ym., 2000, s.874; Kamínek, 2015). Luonnollisissa ympäristöissä villityypin kasveissa esiintyvät endogeeniset sytokiniinit voidaan jakaa rakenteellisesti kahteen eri luokkaan, aromaattisiin ja isoprenoidisiin sytokiniineihin (Kuva 1). Luonnolliset sytokiniinit ovat adeniinijohdannaisia, joiden perusrunko on adeniini, mutta erot löytyvät N<sup>6</sup>-terminuksen sivuketjussa. Isoprenoidisia sytokiniinejä esiintyy luonnossa neljä rakenteeltaan eroavaa yhdistettä, kun taas aromaattisia sytokiineja esiintyy viittä erilaista. Aromaattiset yhdisteet ovat luonnossa harvinaisempia kuin isoprenoidiset.

Harvinaisempia aromaattisia sytokiniinejä löytyy luonnossa muun muassa poppelista, tomaatista ja lituruohoista (*Arabidopsis sp.*) (Sakakibara, 2006), kuten myös anisruohosta ja huonevehkoista (*Zantedeschia*) (Mok & Mok, 2001). Aromaattisilla sytokiniineilla N<sup>6</sup>-terminukseen on liittynyt yksi aromaattinen rengas, johon on liittynyt joko OH-hydroksyyli-ryhmä, OCH<sub>3</sub>-metoksiryhmä tai rengas on tyhjä. Liittyneiden ryhmien stereoisomeerisissä paikoissa on myös eroja yhdisteiden välillä. Bentsyyliadeniini (BA) on rakenteeltaan yksinkertaisin aromaattinen sytokiniini, sillä N<sup>6</sup>-terminukseen liittynyt bentsyylirengas on tyhjä.

Topoliineissa bentsyylirenkaaseen on liittynyt OH- hydroksyyli-ryhmä. Topoliineja on neljä erilaista yhdistettä, jotka eroavat toisistaan funktionaalisten ryhmien sijaintien perusteella (Sakakibara, 2006). Orto-topoliinissa (oT) ja meta- topoliinissa (mT) on liittynyt hydroksyyli-ryhmä ja ne ovat BA:n hydroksyloituja muotoja (Mok & Mok, 2001). Näiden yhdisteiden metosijohdannaiset orto-metoksitopoliini (MeoT) ja meta-metoksitopoliini (MemT) ovat korvanneet hydroksyyli-ryhmän metoksiryhmällä. BA:ta on löydetty harvoista kasvilajeista (Sakakibara, 2006) ja tämän jälkeen se on luokiteltu luonnolliseksi sytokiniiniksi (Mok & Mok, 2001).

Isoprenoidiset yhdisteet, jotka ovat huomattavasti yleisempiä kuin aromaattiset sytokiniiniyhdisteet, eroavat toisistaan myös stereoisomeerisyyden ja hydroksyyli-ryhmien vuoksi. Isoprenoidisia yhdisteitä ovat N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentanyyli)adeniini (iP), trans-zeatiini (tZ), cis-zeatiini (cZ) sekä dihydrozeatiini (DZ/ (diH)Z). Myös isoprenoidisissa sytokiniineissa sivuketju sijoittuu adeniinin N<sup>6</sup>-terminukseen. Näistä yhdisteistä iP on ainoa, jossa ei ole hydroksyyli-ryhmää

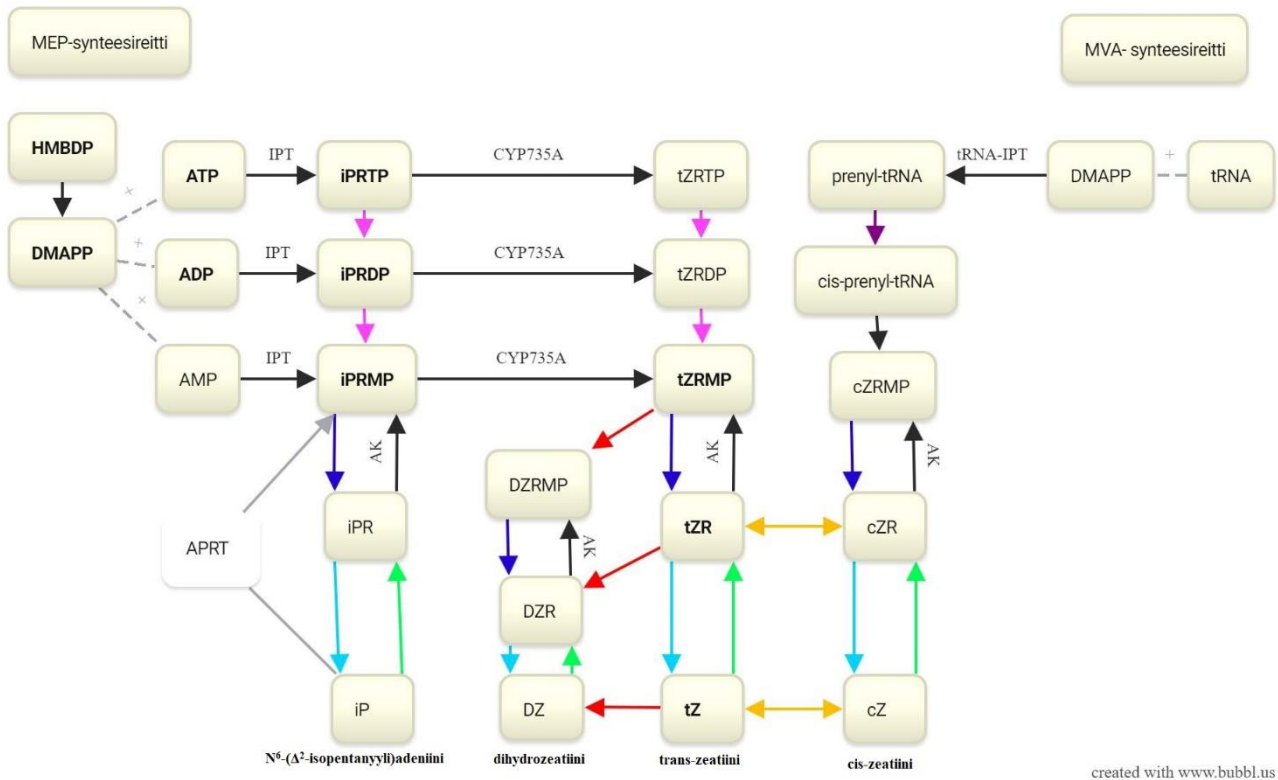
sivuketjun päässä ja cis- zeatiini ja trans-zeatiini ovat toistensa cis-trans isomeerejä. Dihydrozeatiini eroaa trans-zeatiinista sivuketjun kaksoissidoksen puuttumisella. Sytokiniineille on myös yhteistä, että ne voivat glykolysoitua ja saada erilaisia sokerikonjugaatti-sivuketjuja määrittelevän sivuketjun lisäksi (Sakakibara, 2006). Patogeeniset bakteerit kuten *Agrobacterium tumefaciens* voivat myös käyttää sytokiniinejä kasvainten tuottamiseen ja niiden kasvun edistämiseen (Crozier ym., 2000, s.877).

## 2.2 Sytokiniinin luonnollinen biosynteesi

Sytokiniinien luonnollista biosynteesiä on tutkittu paljon *Arabidopsis thaliana*-lajilla (Arabidopsis), jolla on seitsemän *IPT* geeniä, jotka osallistuvat sytokiniinin biosynteesiin (Sakakibara, 2006). Biosynteesireitin tutkimisen mahdollisti kuitenkin limasienestä (*Dictyostelium discoideum*) löydetty biosynteesientsyymi (Åstot ym., 2000). Löydetty entsyymi oli levyadeniini ([3-(3-amino-3-karboksipropyyli)- N6- (2-isopentenyyli) adeniini]) (Sakakibara, 2006), jonka löydön myötä iP oletettiin synteesireitin ensimmäiseksi tuotokseksi (Mok & Mok, 2001). Kyseinen entsyymi kykenee nimittäin muodostamaan iPA:han verrattavaa iPMP:tä AMP:n ja DMAPP:n avulla (Åstot ym., 2000). Sytokiniinin biosynteesi tapahtuu pääosin juurissa, mutta myös kehittyvissä siemenissä ja kärkisilmuissa on havaittu sytokiniin biosynteesiaktiivisuutta (Crozier ym., 2000, s.874).

Sytokiniinin luonnollisen metabolian voi jakaa kahteen ryhmään: Muutoksiin, jotka keskittyvät adeniinin modifikaatioon ja ne, jotka keskittyvät sivuketjujen muokkaamiseen. Emäkset, joita käytetään sytokiniinin pohjana risteävät puriinien metabolisen synteesireitin kanssa. Biosynteesireitin arvellaan myös olevan syklinen eikä lineaarinen (Sakakibara, 2006). Isoprenoidisten sytokiniinien synteesireitit myös risteävät keskenään sivuketjuja muokatessa (Crozier ym., 2000, s.876). Metyylierytritolifosfaatti (MEP) synteesireittiä ja mevalonaatti (MVA) synteesireittiä (Kuva 2) on tutkittu *Arabidopsis*:lla ja erityisesti iP ja tZ muodostuvat pääosin MEP:n kautta, kun taas cZ:n sivuketjut muodostuvat pääasiallisesti MVA:n kautta. Kuitenkin molemmat biosynteesireitit tuottavat kaikkia tarvittavia sivuketjuja (Sakakibara, 2006).





(Kuva 2. Luonnolisten isoprenoidisten sytokiniinien biosynteesireitti. Tummennettuna on oletettu sytokiniinin pääsynteesireitti. Värilliset nuolet edustavat eri reaktiota yhdisteiden välillä. Vaaleanpunainen: Fosforylaatio, tummansininen: 5'-ribonukleotidifosfohydrolaasi, vaaleansininen: Adenosiini nukleosidaasi, vihreä: puriini nukleosidi fosfohydrolaasi, oranssi: entsymaattinen cis-transisomeraasi, punainen: zeatiinireduktaasi ja purppura: cis-hydroksylaasi. AK: Adenosiisikinaasi, APRT: adeniini fosforibosyyli transferaasi, IPT: fosfaatti-isopentenyyli transferaasi. Nimeämättömien mustien nuolien kemiallinen reaktiotausta on vielä epäselvä. Kuva on luotu artikkelien Cytokinin: Activity, Biosynthesis, and Translocation (Sakakibara, 2006) ja kirjan Biochemistry & molecular biology of plants, kappaleen 17 (Crozier ym., 2000, s. 874–877). pohjalta)

### 2.2.1 MEP- synteesireitti

Sytokiniinin biosynteesi on monimutkainen reaktiosarja, jota katalysoivat monet eri entsyymit. MEP- reitti käyttää hydroksimetyyllibutenyyliidifosfaattia (HMBDP), joka muokataan dimetyylliallyyliidifosfaatiksi (DMAPP). DMAPP liitetään ATP:tä tai ADP:tä käyttäen adenosiini - fosfaatti-isopentenyltransferaasiin (IPTs) (Sakakibara, 2006). Kasvilajista riippuen myös AMP:hen voidaan liittää sivuketju suoraan. DMAPP on erityisen tärkeä yhdiste biosynteesireitille, sillä se on tutkitusti ainut mahdollinen sivuketjun luovuttaja, jonka reseptorit tunnistavat (Crozier ym., 2000, s.874).

Muodostuvat yhdisteet fosforyloidaan fosfataasin toimesta, kunnes iP ribosidi 5'- monofosfaatti (iPRMP) on muodostettu. Fosfohydrolaasin avulla iPRMP muokataan iPR.ksi ja

adenosiini nukleosidaasin avulla sytokiniinin nukleoemäs iP:ksi. Lopputuoteen ja iPRMP:n välillä on myös palautuva reaktio, joka on adenosiinikinaasin (AK) ja adeniini fosforibosyyli transferaasin (APRT) katalysoima. Lopputuloksena on syklinen reitti, joka muodostaa metabolisen poolin. Tätä iPRMP ja iPRDP poolia voidaan tarpeen tullen katalysoida etenevästi tai palautuvasti (Sakakibara, 2006). iPRMP:n pitoisuudet solukoissa ovat normaalisti hyvin alhaiset sen ollessa hyvin keskeisessä osassa iP:n ja zeatiinien biosynteesissä. Kyseinen yhdiste muokataan nopeasti myös zeatiinien biosynteesireitille, josta kerrotaan lisää seuraavassa kappaleessa (Crozier ym., 2000, s.875).

IPT:n ja DMAPP:n reaktiosta syntyy iPRTP:tä, iPRDP:tä tai iPRMP:tä riippuen siitä onko reaktiossa ollut mukana ATP, ADP vai AMP. Nämä yhdisteet ovat mahdollista muuttaa käytettäväksi tZ:n ja DZ:n synteesireiteille. CYP735A -entsyymi hydroksyloi iP:n synteesireisin nukleotidit (iPRTP/iPRDP/iPRMP) tZ:n nukleotideiksi lisäämällä rakenteeseen hydroksyyli ryhmän. Reaktiota katalysoi sytokromi P450 monooksidaasi, jolla on A1 ja A2 variaatiot. Entsyymit ovat alttiimpia reagoimaan iPRDP:n ja iPRMP:n kanssa kuin iPRTP:n kanssa muodostaen iZRDP ja iZRMP yhdisteet. Kuitenkin iZRTP:n muodostumista tavataan (Sakakibara, 2006). Isoprenoidisten sytokiniinien biosynteesireittejä on monia, mutta tämän vaihdoksen iP:n synteesireitiltä tZ:n synteesireitille uskotaan olevan kasvien ensisijainen sytokiniinin biosynteesireitti (Crozier ym., 2000, s.876).

CYP735A:n hydroksyloimat yhdisteet voidaan defosforylroida iZRMP muotoon ja fosforylroidaan kuten iP, jotta voidaan muodostaa tZ ribosiiniksi (tZR) ja lopulta trans-Zeatiiniksi (Sakakibara, 2006). Zeatiinien muodostus tapahtuu suurimmissa osin juurissa, koska CYP735A-entsyymi kerääntyy juurten nilaan, jolloin iP:t voidaan tehokkaasti muuttaa zeatiineiksi (Veselov ym., 2018). Puriini nukleosiinifosforylaation avulla tZ -biosynteesireitin molekyylit voidaan muuttaa DZ:n biosynteesireitin molekyyleiksi. Muodostuvat vastaparit synteesireitille ovat DZRMP, joka vastaavasti voidaan muokata DZR:ksi edeltävästä yhdisteestä tai suoraan tZR:stä. Myös valmis tZ voidaan muokata DZ:ksi tai fosforylroida DZR:stä (Sakakibara, 2006). Erityisesti palkokasveilla DZ on yleisesti tavattu sytokiniinin muoto. DZ:n molekyylirakenteen ansiosta se on myös immuuni oksidaasille ja näin ollen odotettua yleisempi ja biologisesti aktiivisempi (Crozier ym., 2000, s.877).

### 2.2.2 MVA- synteesireitti

MVA- reittiä kulkeva iPn ja tZ:n biosynteesi on suurilta osin samankaltainen kuin MEP-reitin biosynteesi, mutta HMBDP -välivaihe jää pois ja biosynteesireitti tuottaa suoraan DMAPP:a. MVA-reittiä kasvi kuitenkin hyödyntää cZ:n tuotannossa, jolloin DMAPP:n ja lähettiRNA:n välisessä reaktiossa muodostetaan isoprenoidisen sivuketjun esiaste. Muodostunut yhdiste reagoi tRNA-IPT:n kanssa muodostaen prenyyli-tRNA:n. Prenyyli-tRNA muokataan cis-prenyyli-tRNA:ksi sytokiniini cis- hydroksylaation avulla. Syntynyt yhdiste muokataan cZ ribosidi 5'-monofosfaatiksi (cZRMP), joka iPRMP:n vastaava yhdiste cZ:n sivuketjussa.

Isoprenoidisille sytokiniineille yhtenevästi cZRMP muokataan cZR:ksi ja lopulta valmiiksi cis- Zeatiiniksi. Cis-trans isomeraasin avulla tZR ja tZ voidaan kääntää cZR:ksi ja cZ:ksi tarpeen tullen, kuten myös toisin päin (Sakakibara, 2006). Tästä isomeerisesta läheisyydestä huolimatta cZ on pitoisuuksiltaan inaktiivisempi ja vähäisempi sytokiniinin muoto tZ:n verrattuna (Mok & Mok, 2001; Quesnelle & Emery, 2007). Mahdollinen selitys sen vähäpätöisempään asemaan sytokiniiniyhdisteenä on sen vaihtoehtoinen synteesireitti tRNA:sta, joka on alttiimpi hajoamaan solukossa (Mok & Mok, 2001). Siitä huolimatta cZ:llä on myös tärkeä säätelijän rooli herneen embryogeneesin alkuvaiheessa ja säätelevä rooli siemenen kehityksessä (Quesnelle & Emery, 2007).

Isoprenoidisille zeatiinityypin sytokiniineille on löydetty myös vaihtoehtoinen iPMP - riippuvainen biosynteesireitti. Kyseisen iP- nukleotidiriippumattoman synteesireitin hydroksylaatioreaktiotekijät ovat kuitenkin tuntemattomia, mutta oletettavasti lähtöisin MVA-reitiltä (Sakakibara, 2006) .

### 2.2.3 Muut modifikaatiot

Sytokiniinien homeostasian ylläpitoon vaikuttavat sytokiniinen jatkomuokkaukset konjugaattien ja oksidaasin avulla (Li ym., 2013; Srivastava, 2002, s.198).Valmiita sytokiniinejä voidaan muokata vielä glykolyysillä. Sekä isoprenoidisiin, että aromaattisiin sytokiniineihin voidaan lisätä sokerikonjugaatti. Aromaattisilla ja isoprenoidisilla sytokiniineilla olevat reseptorit ovat samanlaisia, joten niiden glykolysoitumiset eivät eroa toisistaan. Varmaksi tiedetään kuitenkin vain isoprenoidisten sytokiniinen modifikaatiot (Mok & Mok, 2001). Yhdisteeseen kohdistuvat muutokset kuitenkin vaikuttavat sytokiniini reseptoreihin, tehden niistä tarkempia ja näin vaikuttaen myös sytokiniini sitoutumiseen reseptorissa (Li ym., 2013).

Suurin osa modifikaatioista keskittyy isoprenoidiseen sivuketjuun, mutta myös adeniinin puriinille on havaittu tapahtuvan muutoksia. MVA-synteesireitille ominaisissa tRNA yhdisteissä on

havaittu metyyllithiolijohdannaisia cZR:stä (2-Metyyllithio-9-ribosyyli-cis-zeatiini), mutta myös pieninä määrinä sen isomeerisistä tZR vastineesta (2-Metyyllithio-9-ribosyylyzeatiini). Metyyllithiolijohdannaisia on löydetty myös iP:n reitiltä iPR:n johdannaisena (2-Metyyllithio- N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentanyyli)adenosiini) (Crozier ym., 2000, s.880–881).

#### 2.2.3.1 Glykolysaatio

Puriiniosan glykosylaatiota katalysoi N- glykosyyli transferaasi. Adeniiniosan glykolysoitumiset tapahtuvat pääasiassa N3, N7 ja N9 -terminuksissa, ja ne ovat peruuttamattomia muutoksia. Sokerikonjugaatti  $\beta$ -D-glykoosin muodostumiseen vaikuttavat myös entsyymit, joita on tutkittu *Arabidopsis* -suvun edustajilla (Sakakibara, 2006).

*Arabidopsis*-kasveista on löydetty UGT76C1 ja UGT76C2 entsyymit, jotka vaikuttavat N7 ja N9 -paikkojen glykosyloitumiseen, jossa tZ-O-glykosidi (tZOG) yhdiste toimii osallisena, vaikuttaen vain N7:n glykosylaatioon . Sivuketjun glykolysaation katalysoija on O-glykosyyli transferaasi, joka muodostaa myös  $\beta$ - D glykoosin sivuketjuun (Sakakibara, 2006). Transferaasin transkriptioon vaikuttavia geenejä on onnistuttu eristämään kaksi eri muotoa: *ZOG1* ja *cisZOG1*. O-glykosyyli transferaasi on hyvin valikoiva sokerikonjugaatin ja sytokiniin välillä. Tästä johtuen on oletettavaa, että O- glykosylaation toiminta on säädelty yksilöllisesti jokaiselle sytokiniinille (Mok & Mok, 2001).

Toinen mahdollinen sivuketjun glykosylaation katalysoija on O-ksylosyyli transferaasi, joka muodostaa  $\beta$ -D- ksyloosin sivuketjuun. Vain DZ ja tZ sytokiniineissä tavataan  $\beta$ -D-ksyloosia (Sakakibara, 2006). O-ksylosyyli transferaasiin vaikuttava geeni *ZOX1* on löydetty ja eristetty kasveista. On myös mahdollista, että kasveissa esiintyy vielä kolmas transferaasi, joka vaikuttaa tZ ja DZ väliseen muutokseen. Kyseinen transferaasi muokkaisi DZ:n O-glykosyyli dihydrozeatiiniksi. Kuitenkaan kyseistä transferaasia ei ole vielä onnistuttu eristämään kasveista (Mok & Mok, 2001).

#### 2.2.3.2 Oksidaatio

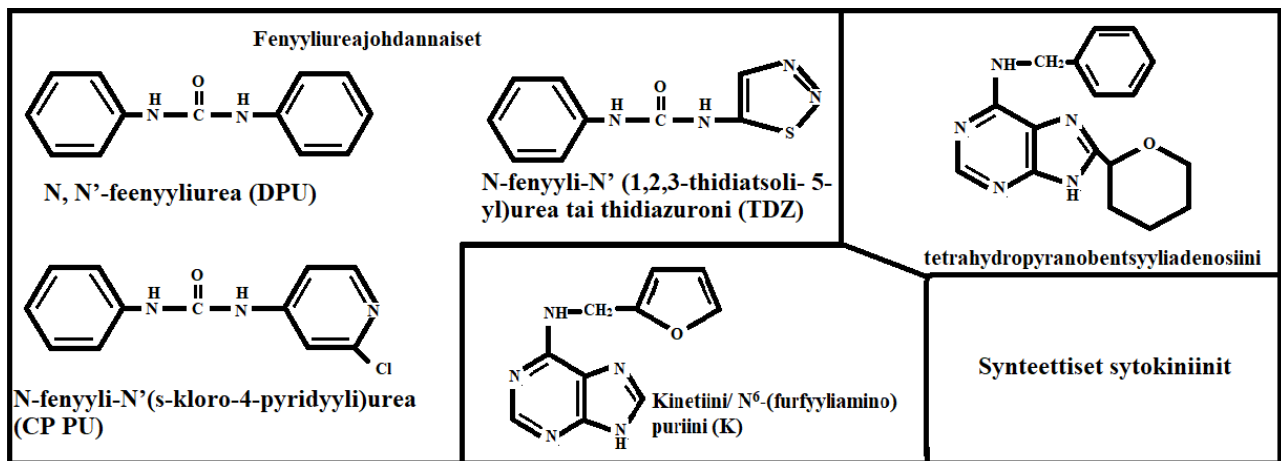
Sytokiinin oksidaasi/dehydrokinaasi (CKX) katalysoi peruuttamatonta sivuketjujen muokkaamista, jolloin sytokiniini menettää aktiivisuutensa (Sakakibara, 2006). Tyydyttymätön isoprenoidinen sivuketju irrotetaan N<sup>6</sup>- terminuksesta (Ashikari ym., 2005). Oksidaasin kohteeksi joutuneet sytokiniinit, yleisesti tZ ja iP, muokataan takaisin adeniiniksi. Irrotettu ja muokattu isoprenoidinensivuketju iP:n tapauksessa on tunnistettu 3-metyyli-2-butenaaliksi (Crozier ym., 2000, s.881; Mok & Mok, 2001). iP sytokiniinin oksidaatio voi tapahtua jo iPR muodossa, mutta se muokataan adeniiniksi ja 3-metyyli-2-butenaaiksi. CKX:n ja glykosyyli transferaasien kautta sytokiniinin aktiivisuutta ja gradienttia säädelään. Oksidaatio on siis metabolisesti sytokiniinille luontainen reitti (Crozier ym., 2000, s.879; Sakakibara, 2006).

Aromaattiset sytokiniinit ja DZ ovat CKX:n vaikutusalueen ulkopuolella, jolloin näihin yhdisteisiin CKX ei tee muutoksia. CKX:n toiminta perustuu isoprenoidisten sytokiniinien sivuketjun kaksoissidoksen havaitsemiseen, erityisesti tZ ja iP ovat alttiita CKX:n muutoksille (Sakakibara, 2006). Kuitenkin on oletettavaa, että aromaattisiin sytokiniineihin vaikuttavia oksidaaseja on, mutta niitä ei vielä ole löydetty. Sytokiniinin oksidaatioon vaikuttavat geenit *ckx* ja *CKO* on eristetty entsymaattisesti ja geeninä niin tZ:sta kuin iP:stäkin. Synteettisillä sytokiniinit kuten CP PU ja thidiazuroni (TDZ) ovat vahvoja sytokiniinioksideasin inhibiittoreita (Mok & Mok, 2001). Sytokiniinioksideatio on tutkimusten mukaan voimakkaampaa juurissa kuin lehdisissä (Veselov ym., 2018).

### 2.3 Synteettiset sytokiniinit

Synteettiset sytokiniinit ovat yhdisteitä, joilla on luonnollisten sytokiniinien kanssa samanlainen vaikutus kasvisolukoihin. Ensimmäinen synteettinen sytokiniinin lailla käyttäytyvä yhdiste oli kinetiini eli N<sup>6</sup>-(furfyyliamino)puriini (K), joka löydettiin 1950-luvulla (Mok & Mok, 2001; Srivastava, 2002, s.191) ja eristettiin ensikerran Carlos Millerin työryhmän ansioksi joulukuun 16. 1954 (Kamínek, 2015). Kinetiini on adeniinijohdannainen, joka syntyy DNA:n autoklaavaamisen tuotteena (Crozier ym., 2000, s.874). Se löydettiin silakan sperman DNA:sta ensimmäisenä (Srivastava, 2002, s.191). DNA:n oli kuitenkin oltava vanhentunutta tai autoklaavattua happamissa olosuhteissa, jotta se toimisi toivotulla tavalla (Kamínek, 2015). Synteettisillä yhdisteillä voi myös olla adeniinin perusrakenne, jossa on muokattuja sivuketjuna, mutta täysin eroavat rakenteet ovat myös mahdollisia (Kuva3) (Mok & Mok, 2001).

Tehokkain löydös tähän asti on 6- bentsyyliaminopuriini/ bentsyyliadeniini (BA/BAP) (Crozier ym., 2000, s.874), jota valmistetaan synteettisesti, vaikka sitä esiintyy myös luonnossa. Toinen esimerkki synteettisestä yhdisteestä, jolla on sytokiniiniaktiivisuutta on tetrahydropyranobentsyyliadenosiini (Srivastava, 2002, s. 200–201). Synteettisiä sytokiniineja syntetisoidaan myös adeniinin sijasta fenyyliureasta. N, N'-feenyyliurea (DPU), N-fenyyli-N'(s-klooro-4-pyridyyli)urea (CP PU) ja N-fenyyli-N' (1,2,3-thidiatsoli -5yl)urea tai thidiazuroni (TDZ) ovat esimerkkejä synteettisistä sytokiniineista (Mok & Mok, 2001; Srivastava, 2002, s. 201). Kinetiini on BA/BAP:n ohella käytetyin synteettinen sytokiniini (Collin & Edwards, 1998, s.21; Srivastava, 2002, s. 200).



(Kuva 3 Esimerkkejä syntteetisistä sytokiniineista ja niiden molekulaarisista rakenteista. Kuva piirretty artikkelin Cytokinin metabolism and action (Mok & Mok, 2001) ja kirjan Plant Growth and Development : Hormones and Environment (Srivastava, 2002, s.201) pohjalta. )

### 3 Sytokiniinin kuljetus ja vaikutukset kasvilla

#### 3.1 Sytokiniinien kuljetus

Sytokiniini siirtyy solujen välillä passiivisesti diffuusion välityksellä tai aktiivisesti siirtäjien avulla. Aktiivisessa siirrosta pääasiallinen kohde on sytokiniinin puriinosan siirtäminen soluun, joka aiheuttaa tZR ja iPR sytokiniinien kertymistä nilaan ja ksyleemiin (Sakakibara, 2006). Erityisesti tZR kulkeutuu ksyleemissä ja iPR nilassa (Veselov ym., 2018). Nilassa sytokiniinin kuljetus on systemaattista, mutta ksyleemissä se tapahtuu akropetaalisesti kohti kärkeä (Ashikari ym., 2005).

Aktiivisia sytokiniinien siirtäjiä on löydetty *Arabidopsis*- suvun edustajilta kolmea erilaista 2000-luvun tutkimuksissa. Löydettyihin siirtäjiin kuuluvat puriinipermeaasit (PUPs), joita on löydetty 23 erilaista, sekä tasapainottavat nukleosidisiirtäjät (*eng.* Equilibrium nucleoside transporters, ENT) ja ATP- sitojiin (ABC) kuljettajiin kuuluva G alaheimo. Siirtäjien toiminta on vielä heikosti tunnettu, mutta osa PUP yhdisteistä vaikuttaa plasmamembraanin läpi tulleisiin sytokiniineihin.

ENT-siirtäjällä on myös ihmiskehossa vastaavanlainen hormonisiirtäjä, jonka tavoin kasvien ENT-siirtäjillä on protoniriippuvainen siirtotapa. *Arabidopsis* ENT:n (AtENT) muodoilla kuusi ja kahdeksan on todettu olevan sytokiniinin siirtämisominaisuuksia. Näistä AtENT6 siirtää iPR:ia ZR:n sijaan (Skalický ym., 2018). Riisillä tehtyjen tutkimusten ansiosta OsENT2 ekspressio on rajattu johtosolukon nilaan, minne se siirtää sytokiniineja kuljetusta varten. PUP ja ENT- siirtäjien transkriptiota sääteleviä geenejä on identifioitu nilasta (Veselov ym., 2018). PUP14:n tiedetään

olevan tärkeässä roolissa kasvin varhaisessa kehityksessä (Skalický ym., 2018). PUP14 myös mahdollistaa sytokiniinien siirron sytosoliin apoplastisesta kuljetuksesta (Veselov ym., 2018). Näistä kolmesta siirtäjäryhmästä ABCG- siirtäjistä tiedetään vähiten, mutta ABCG14 siirtäjän on havaittu olevan osallisena sytokiniinien siirtämisessä juurista versoon (Skalický ym., 2018; Veselov ym., 2018).

### 3.2 Sytokiniinien signalointi

*IPT* on vahvasti sytokiniinin säätelyyn vaikuttava tekijä, sillä se on biosynteesin aloitusvaiheelle välttämätön katalyytti ja säätelijä (Li ym., 2013). *IPT*:n ekspressio lisää sytokiniinin tuotantoa kasvilla, kun taas *IPT*:n ekspression vähentäminen pienetää tuotetun sytokiniinin määrää (Gan & Amasino, 1995). Biosynteesireittiin vaikuttavia *IPT*- geenejä on löydetty seitsemän *Arabidopsis thalianasta* (*AtIPT*- geenit 1, 3-8) ja kaksi herneistä (*PsIPT*1-2). Sytokiniini voi toimia myös yhteisvaikutuksessa muiden kasvihormonien kanssa ja toimia tasapainottavana tekijänä muiden hormonien vaikutuksille (Sakakibara, 2006).

*Arabidopsis thalianasta* löydetty vastesäätelijä *AAR*- geeni osallistuu sytokiniinin säätelyyn. Tyypin A *ARR*- geenit (*ARR3-9*, *15-17* ja *22*) vaikuttavat negatiivisesti sytokiniiniin linkittyneisiin geeneihin, kun taas tyypin B (*ARR1-2*, *10-14* ja *18-21*) geenimuoto vaikuttaa positiivisesti sytokiniinin säätelyyn ja signalointiin. Sytokiniini voi toimia kehityksen edistävänä tekijänä tai inhiboivana tekijänä tasoittaen toisen hormonin vaikutusta (Li ym., 2013).

Signaloinnille tärkeät sytokiniini reseptorit kuten Arabidopsiksen histidiinikisaanit (AHK) sijaitsevat solukon plasmamembraanissa tai ER:ssä (Skalický ym., 2018). Sytokiniini reseptoreita ovat histidiinikinaasit AHK2-4, CRE1 ja WOL (Li ym., 2013). Näistä reseptoreista AHK3 on reaktiivisin zeatiininriboosimuodoille (Sakakibara, 2006).

### 3.3 Sytokiniinien vaikutukset

Sytokiniinit vaikuttavat kasvien apikaalidominanssiin yhteisvaikutuksessa auksiinien kanssa. Ne ovat myös välttämättömiä solun jakautumisessa ja erilaistumisessa, sekä näiden prosessien säätelyssä. Lisäksi sytokiniinit vaikuttaa myös kasvin juuri-verso suhteeseen (Gantait ym., 2014; Sakakibara, 2006) sekä viljakasvien tuottavuuteen (Ashikari ym., 2005; Gan & Amasino, 1995; Sakakibara, 2006) niin ravinnesignaloinnin kautta kuin seneskenssiä viivyttämällä (Gan & Amasino, 1995; Sakakibara, 2006). Sytokiniinit vaikuttavat myös embryogeneesiin, siementen kehitykseen, organogeneesiin, stressin sietoon ja putkiloiden muotoon, kuten myös lehtien

rakenteen morfogeneesiin (Li ym., 2013). Kuitenkin sytokiniin liiallinen läsnäolo voi olla haitaksi juurien ja pidempien versojen kasvulle (Bindu ym., 2007; Vasudevan & Staden, 2011). Alla on esitelty muutamia konkreettisia vaikutuksia, joita sytokiniinillä on kasvien kasvuun ja kehitykseen.

### 3.3.1 Solusyklin säätely

Solusyklin säätelyssä sytokiniini vaikuttaa vahvasti G1 ja G2 vaiheissa. G1 vaiheessa sytokiniini edistää ja mahdollistaa uuden solusyklin alkamisen vaikuttamalla CYCD3- sykliiniin ekspressioon, joka mahdollistaa uuden solusyklin alkamisen. Sytokiniini vaikuttaa myös syklin siirtymiseen G2 - vaiheesta M vaiheeseen, mahdollistaen CDK (Cycling-dependent-kinases) toiminnan aktivoimalla sen inhibiittorin fosforyloimisen. Sytokiniinin puute johtaa myös kinaasien aktiivisuuden vähenemiseen solussa (Doerner, 2000, s.558–559).

### 3.3.2 Lehden pintasolukon muodostuminen

Kasvin lehtien päällyssolujen (eng. pavement cells, PC) morfogeneesiin vaikuttaa sytokiniinin signaali. Epäsäännölliset palapeliä muistuttavat lohkot muodostuvat auksiinin vaikutuksesta, mutta niiden sitoutumista toisiinsa ja solun polaarisuutta säätelee sytokiniini.

Sytokiniinireseptoreita, kuten AHK, jotka vaikuttavat sytokiniin transkriptioon on löydetty *Arabidopsis thaliana*sta ja ne aktivoituvat histidiinien konservoituneen autofosforylaation kautta.

Sytokiniinin puuttuessa päällyssoluille kehittyi niille tyypilliset lohkot, jotka mahdollistavat solujen välisen tiiviin yhdistymisen. Kuitenkin sytokiniin läsnäollessa hormoni inhiboi lohkojen kehitystä, vaikuttaen sirkkalehtien embryogeneesiin. Sytokiniini vaikuttaa päällyssolujen kehitykseen *ARR*- geenin kautta. Auksiinin ja sytokiniin yhteisvaikutuksesta päällyssolujen muodostumista säädellään tasoittavasti eri solukoissa. (Li ym., 2013).

### 3.3.3 Seneskenssin hidastaminen tai estäminen

Sytokiniini vaikuttaa solutasolla solunjakoon, kantasolujen erilaistumiseen ja kloroplastien biosynteesiin (Li ym., 2013). Sytokiniinillä on vaikutuksia myös klorofyllin seneskenssiin (Åstot ym., 2000). Transgeenisillä tupakan (*Nicotiana tabacum*) versoilla on tutkittu sytokiniinin vaikutusta seneskenssiin. Seneskenssi on lehden elinkaaren päätevaiheessa oleva ohjelmoitu solukuolemien vaihe, jossa solukon struktuuria ja metaboliaa muokataan kontrolloidusti (Gan & Amasino, 1995).



*Arabidopsis thaliana*sta löydetty seneskenssiin assosioitunut geenit (SAGs), joista *SAG12* on seneskenssiin spesifioitunut. Kimeerinen geeni *P<sub>SAG12</sub>-IPT*, joka muodostui *SAG12*:n promootorialueesta *P<sub>SAG12</sub>* yhdyttynä *IPT*:n koodaavaan alueeseen, siirrettiin tupakan (*Nicotiana tabacum*) lehtien solukkoon. Tutkimuksissa transgeenisten kasvien ja villityyppien itsepölytteiset jälkeläiset eivät eronneet koon, nuppujen ja lehtien määrän välillä. Erot kasvien kehityksessä näkyivät seneskenssin viivästymisellä yli kuukauden verran. Viivästynyt seneskenssi lisäsi kasvin siementen tuottoa ja kukkimisaikaa, kuten myös fotosynteesiaktiivisuutta (Gan & Amasino, 1995).

### 3.3.4 Ravinteiden säätely

Sytokiniini vaikuttaa myös kasvin ravinnetasapainoon, jonka säätelijänä typen nitraatti ( $\text{NO}_3^-$ ) vaikuttaa vahvasti. Ksyleemin putkiloiden avulla tapahtuva sytokiniinin signalointi on tyyppistä riippuvaista. Sytokiniini mahdollistaa typen gradientin säätelyn lehden ja juuren välillä, vaikuttaen koko kasvin ravinnesignalointiin. Nitraatti vaikuttaa myös lehdessä olevien iP-sytokiniinien biosynteesiin indusoimalla *AtIPT3* tai *AtIPT5* geenien transkriptiota. *AtIPT5* voi hyödyntää myös ammonium-ioneita ( $\text{NH}_4^+$ ) iP:n tuotannossa. Muodostuva iP siirretään lopulta nilaan (Sakakibara, 2006).

## 4 Sytokiniinin käyttö kaupallisessa tuotannossa

Sytokiniinejä käytetään solukkoviljelyn kaupallisessa tuotannossa vaihtelevasti ja eri alustoille, kasvilajeille ja tarkoituksiin. Useimmiten käytetyt yhdisteet ovat kuitenkin kinetiini ja BA (Vasudevan & Staden, 2011). Täysin synteettiset yhdisteet kuten TDZ ja CP PU ovat sytokiniiniaktiivisuudeltaan tehokkaampia kuin luonnolliset sytokiniinit, jonka vuoksi niitä voidaan käyttää erityisiin tarkoituksiin ja kohdistetummin. TDZ sopii paremmin puuvartisille kasveille edistämään versojen kasvua, mutta BA toimii yleisesti kaikille paremmin.

CP PU indusoi kalluksen muodostusta ja erilaistumista, kuten myös hedelmien suurentumista ja kehitykseen viivästymistä. Kuitenkin TDZ ja CP PU sopivat vain tietyille lajeille solukkoviljelyssä ja voivat edistää ei toivottua hyperhydraatiota (Kadota & Niimi, 2003). Luonnolliset sytokiniinit, kuten zeatiinit ja topoliinit ovat vaikeammin käytettävissä ja isopreenisiä yhdisteitä ei voida syntetisoida keinotekoisesti kuten BA:ta, minkä vuoksi se on niitä enemmän käytetty sytokiniini yhdiste (Crozier ym., 2000, s.874).

Solukkoviljelyn käyttö kaupallisessa tuotannossa kohdistuu tyypillisesti kasvien sekundaarisiiin metaboliitteihin (Davies & Deroles, 2014). Elin- tai osaviljelmiä (eng. organ culture) voidaan käyttää kasvin tiettyjen osien systemaattiseen tuottamiseen ja ylläpitämiseen. Kasvin osia, kuten juuria, embryoita ja versoja voidaan tuottaa niiden laboratoriolloissa ja niistä voidaan eristää sekundaarimetaboliitteja (Wilson & Roberts, 2012). Solukkoviljelyssä voidaan käyttää hyväksi myös *A. rhizogens* bakteerin avulla luotavaa juuriviljelmää (eng. hairy root culture), jota voidaan käyttää bioreaktoreissa (Davies & Deroles, 2014; Wilson & Roberts, 2012). Näissä reaktoreissa sytokiniini osallistuu elinten muodostuksen edistämällä solujakoa alkion sydämenmuotoisessa kasvu vaiheessa (Quesnelle & Emery, 2007).

Sekundaarisista metaboliitteista voidaan jalostaa lääkeaineita, funktionaalisia elintarvikkeita sekä kosmetiikka teollisuuden raaka-aineita. Lääkeaineteollisuuden kaupallinen esimerkki on paklitakseli (Davies & Deroles, 2014), joka on eristetty lännenmarjakuusen (*Taxus brevifolia*) kuoresta. Paklitakseli on sekundaarinen metaboliitti, jonka kokonaisvaltainen synteesireitti on onnistuttu luomaan synteettisesti laboratorio-olloissa (Wilson & Roberts, 2012).

#### 4.1 Esimerkkilajina *Aloe vera* sp.

*Aloe vera* on *Liliaceae*- heimon tunnetuimpia *Aloe*- suvun edustajia (Gantait ym., 2014), mutta heimoon kuuluu jopa 500 lajia (Liao ym., 2004). *A. vera*, kuten moni muukin suvun edustaja on monikäyttöinen niin lääke-, ruoka- ja kosmetiikkateollisuudessa kuin luonnollisena lähihoitokasvina. Aaloen lehdet koostuvat kolmesta eri kerroksesta; joista uloin kerros on 15-20 solun paksuinen proteiinien ja hiilihydraattien syntetisoija alue. Keskimmäinen kerros on lateksinen antrakionia ja glykosiideja sisältävä mahlakerros ja sisimpänä on lajille tyypillinen ja tunnusomainen geelikerros (Gantait ym., 2014). Lehden sisällä olevassa geelissä on 99,3% pelkkää vettä ja 0,7% sokereita (glukoosi ja mannoosi), jotka yhdistettynä aminohappoihin ja entsyymeihin tuottavat kasvin lääkinnälliset ominaisuudet (Molsaghi ym., 2014).

Aaloeta on käytetty pitkään ihmisen historiassa lääkinnällisenä kasvina ja hoitona erilaisiin vammoihin, kuitenkin jokainen aaloelaji ei ole lääketieteellisesti hyödyllinen (Liao ym., 2004). Ehkäisevää vaikutusta aaloella on niin hyvä- kuin pahalaatuisiin kasvaimiin, kuten myös bakteeri- ja virusinfektioihin. Itse lehdillä voidaan hoitaa ihon bakteeri- ja sienisairauksia ja aaloella on rauhoittavaa vaikutusta palovammoihin, haavaumiin sekä tulehduksiin (Liao ym., 2004; Molsaghi ym., 2014).

Sytokiniinin osuus Aaloen *in vitro* viljelyssä on merkittävä ja sitä voidaankin sanoa tutkimuksien perusteella Aaloen versojen lisääntymisen kannalta tärkeimmäksi kasvihormoniksi

(Gantait ym., 2014; Molsaghi ym., 2014). Kasvatusliuos massatuotannossa on pääsääntöisesti Murashige ja Skoog (MS)- alusta, jonka sokeripitoisuudeksi 2-3 % on todettu parhaaksi (Gantait ym., 2014) ja kasvihormonien tapauksessa auksiinin ja sytokiniinin 1:4 suhde on yleispätevä (Molsaghi ym., 2014), vaikka eroja eri lajien välillä on havaittavissa, kuten *A. arborescens*:n kohdalla havaittu 1:10 -suhde (Liao ym., 2004). Kuitenkin myös pelkkää sytokiniiniä käyttäen on saatu tuloksia ja onnistuttu lisäämään *A. vera* terveenä ja hyvinvoivana. Parhaat tulokset saadaan käyttämällä synteettistä BA sytokiniiniä, joka selvästi lisää uusien silmujen määrää kasvatusalustalla (Molsaghi ym., 2014). Pelkän sytokiniin avulla on saatu tuloksia myös muilla kasveilla kuin *A. veralla* (Watt, 2014).

Organogeneesiä ja kalluksen muodostusta on tutkittu *Aloe vera*:lla eri auksiini- ja sytokiniiniyhdistelmien avulla. Lisäyksissä on tutkittu miten kasvin eri solukot reagoivat hormoneihin. Jokaisessa onnistuneessa kasvatusliuoksessa sytokiniini oli lisättynä alustaan yleisimmin BA:n muodossa, mutta onnistuneita tuloksia saatiin kinetiinin ja mT:n avulla (Gantait ym., 2014). Kinetiiniä käytettäessä erot BA:n kanssa kasvatetuissa versoissa olivat huomattavia version pituuden suhteen. On siis syytä olettaa, että eri hormonyhdistelmät sytokiniinin ja auksiinin välillä, kuten myös eri synteettiset sytokiniinit, voivat vaikuttaa kasvatettavaan solukkoon eri tavalla (Molsaghi ym., 2014).

## 5 Johtopäätöksiä

Sytokiniin tärkeydestä johtuen sen käyttö ja tärkeys solukkoviljelyssä ei todennäköisesti tule muuttumaan. Kuitenkin sen käyttötavat voivat muuttua tulevaisuudessa. Sytokiniinien yhteistoimintaa muiden hormonien ja varsinkin uusien hormonien kanssa on kuitenkin syytä tutkia. Vaikka sytokiniini on paljon tutkittu hormoni, myös sen signalointireiteiltä ja muodostumisesta löytyy tutkimattomia reaktioita (Skalický ym., 2018).

Sytokiniinien ollessa tärkeässä roolissa hormonaalisessa yhteisvaikutuksessa muiden hormonien kanssa, sen biosynteesin ja kuljetuksen parempi ymmärtäminen ja kokonaisten reaktiosarjojen identifioiminen olisi kasvien hormonaalisen homeostasian kannalta tärkeää. Sytokiniini vaikuttaa pysyvän edelleen tärkeänäsolukkoviljelyssä. Kasvilajeista ja viljelyntarkoituksesta riippuen sytokiniinin ulkoista lisäystä ei välttämättä vaadita, mutta sytokiniini on silti solukkoviljelylle edelleen tärkeä ja eri viljelmätyypit mahdollistava hormoni. Kalluksen ja siitä erilaistuvien solulinjojen muodostukseen vaaditaan kuitenkin sytokiniiniä, sen ollessa tärkeässä osassa solusykliä ja homeostasian ylläpitoa.

## 6 Lähdeluettelo

- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., . . . Matsuoka, M. (2005). Plant science: Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309(5735), 741-745. doi:10.1126/science.1113373
- Åstot, C., Dolezal, K., Nordström, A., Wang, Q., Kunkel, T., Moritz, T., . . . Sandberg, G. (2000). An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14778-14783. doi:10.1073/pnas.260504097
- Bindu, P., Pious, T., Tolety, J., Rangarajan, V., & Sathyanarayana B. Narayanappa. (2007). Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(6), 614-622. doi:10.1007/s11627-007-9061-6
- Collin, H. A., & Edwards, S. (1998). In Rickwood David, Howe Chris (Toim.), *Plant cell culture*. Oxford, UK: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Crozier, A., Kamiya, Y., Bishop, G., & Yokota, T. (2000). In Buchanan B. B., Jones R. L. and Gruissem W. (Toim.), *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville (MD): American Society of Plant Physiologists.
- Davies, K. M., & Deroles, S. C. (2014). Prospects for the use of plant cell cultures in food biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 133-140. doi:10.1016/j.copbio.2013.12.010
- Doerner, P. (2000). In Buchanan B. B., Jones R. L. and Gruissem W. (Toim.), *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville (MD): American Society of Plant Physiologists.
- Gan, S., & Amasino, R. M. (1995). Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, 270(5244), 1986-1988. doi:10.1126/science.270.5244.1986
- Gantait, S., Sinniah, U. R., & Das, P. K. (2014). Aloe vera : a review update on advancement of in vitro culture. *Acta Agriculturae Scandinavica: Section B, Soil & Plant Science*, 64(1), 1-12. doi:10.1080/09064710.2013.868924
- Kadota, M., & Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(3), 261-265. doi:10.22378511659
- Kamínek, M. (2015). Tracking the Story of Cytokinin Research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 723-739. doi:10.1007/s00344-015-9543-4
- Li, H., Xu, T., Lin, D., Wen, M., Xie, M., Duclercq, J., . . . Yang, Z. (2013). Cytokinin signaling regulates pavement cell morphogenesis in Arabidopsis. *细胞研究: 英文版*, 23(2), 290-299. doi:10.1038/cr.2012.146
- Liao, Z., Chen, M., Tan, F., Sun, X., & Tang, K. (2004). Micropropagation of endangered Chinese aloe. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(1), 83-86. doi:10.25868515705

- Mok, & Mok. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 52  
doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.89
- Molsaghi, M., Moieni, A., & Kahrizi, D. (2014). Efficient protocol for rapid Aloe vera micropropagation. *Pharmaceutical Biology*, 52(6), 735-739. doi:10.3109/13880209.2013.868494
- Quesnelle, P. E., & Emery, R. J. N. (2007). cis-cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth in vitro. *Canadian Journal of Botany*, 85(1), 91-103. doi:10.1139/B06-149
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 431-449. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231
- Skalický, V., Kubeš, M., Napier, R., & Novák, O. (2018). Auxins and Cytokinins-The Role of Subcellular Organization on Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3115. doi:10.3390/ijms19103115
- Srivastava, L. M. (2002). Plant Growth and Development : Hormones and Environment. *Plant Growth and Development : Hormones and Environment* (). Amsterdam: Academic Press. Retrieved from web.a.ebscohost.com
- Vasudevan, R., & Staden, J. V. (2011). Cytokinin and explant types influence in vitro plant regeneration of Leopard Orchid (*Ansellia africana* Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 107(1), 123-129. doi:10.1007/s11240-011-9964-0
- Veselov, S., Timergalina, L., Akhiyarova, G., Kudoyarova, G., Korobova, A., Ivanov, I., . . . Prinsen, E. (2018). Study of cytokinin transport from shoots to roots of wheat plants is informed by a novel method of differential localization of free cytokinin bases or their ribosylated forms by means of their specific fixation. *Protoplasma*, 255(5), 1581-1594. doi:10.1007/s00709-018-1248-7
- Watt, M. P. (2014). Genotypic-unspecific protocols for the commercial micropropagation of *Eucalyptus grandis* x *nitens* and *E. grandis* x *urophylla*. *Turkish Journal of Agriculture & Forestry*, 38(1), 125-133. doi:10.3906/tar-1304-83
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10(3), 249-268. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00664.x